

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520101153275

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**RBP4 在 NAFLD 大鼠的表达及饮食
或二甲双胍干预的影响**

**Effects of dietary intervention versus metformin treatment
on the expressions of RBP4 in rats with NAFLD**

郭春花

指导教师姓名: 马红 副教授

专 业 名 称: 内 科 学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 5 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 郭春花

2013 年 05 月 29 日

厦门大学学位论文著作权使用声

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：郭春花

2013 年 05 月 29 日

摘 要

目的：通过高脂饮食建立非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）大鼠模型，并予饮食干预或二甲双胍治疗，分析大鼠血清、肝组织视黄醇结合蛋白 4（RBP4）的表达情况及其与肝脏病理病变程度等的相关性，探讨 RBP4 在 NAFLD 发生、发展中的作用及饮食干预、二甲双胍治疗对 NAFLD 的作用和可能机制，为研究 NAFLD 的发病机制和防治方法提供一定的理论依据。

方法：将 50 只 SD 大鼠随机分为对照组 16 只，高脂组 34 只，分别予普通饲料和高脂高能量饲料喂养。喂养 8 周后，禁食 10h，两组各随机处死 8 只大鼠，检测相关指标及留取标本；证明 NAFLD 模型造模成功后，将剩余高脂组 26 只大鼠随机分成高脂组 8 只、饮食干预组 8 只和二甲双胍治疗组 10 只，对照组剩余 8 只予普通饲料喂养。8 周后以相同方法处死所有大鼠。采用酶联免疫吸附法（ELISA）检测血清 RBP4 水平，RT-PCR 法检测肝组织 RBP4 mRNA 表达水平，免疫组织化学法及 Western 印迹分析法检测肝组织 RBP4 表达水平，同时行血脂、肝脏酶学及肝组织病理学检查。

结果：NAFLD 大鼠模型造模成功，随造模时间延长，模型大鼠 NAFLD 病变加重，与 8W 高脂组相比，16W 高脂组肝湿重（ $P<0.01$ ）、肝指数（ $P<0.05$ ）及 NAFLD 勾当度积分（NAS）（ $P<0.01$ ）均升高。NAS：8 周高脂组为 4.67 ± 0.52 ，16 周高脂组为 6.83 ± 1.33 （ $z=-2.69$ ， $P<0.01$ ）；饮食干预组 vs.16W 高脂组（ 3.00 ± 1.26 vs. 6.83 ± 1.33 ， $z=-2.853$ ， $P<0.01$ ）；二甲双胍治疗组 vs.16W 高脂组（ 5.33 ± 0.52 vs. 6.83 ± 1.33 ， $z=-2.047$ ， $P<0.05$ ）。血清 RBP4 在对照组、高脂组、饮食干预组及二甲双胍治疗组均无统计学差异。与对照组相比，高脂组肝组织 RBP4 蛋白及 mRNA 表达均下降，同时伴肝功能异常、脂代谢紊乱和胰岛素抵抗（IR）（ $P<0.05$ ），饮食干预可改善上述情况（ $P<0.05$ ）；高脂饮食情况下单用二甲双胍无明显改善上述情况，且使 ALT 升高（ $P<0.05$ ）。

结论：血清 RBP4 水平在 NAFLD 的发生、发展中可能不是一个敏感指标。随着 NAFLD 的发生肝组织 RBP4 的表达下降，饮食干预可增加肝组织 RBP4 的表达，改善 NASH 的组织学病理变化，表明肝组织 RBP4 可能在 NAFLD 的发病中

起一定的作用。饮食干预应作为防治 NAFLD 的基本措施，二甲双胍可以改善 NAFLD 的肝脂肪变，但需注意用药时机及避免药物性肝损害。

关键词：非酒精性脂肪性肝病 视黄醇结合蛋白 4 饮食干预 二甲双胍

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective: We aim to evaluate the influence of retinol-binding protein 4 (RBP4) on the pathogenesis and development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and the impact of dietary intervention versus metformin treatment on expression of RBP4 in rats with NAFLD.

Methods: Fifty SD rats were randomly divided into the normal control group (16 rats) and the high fat diet (HFD) group (34 rats). Eight weeks later, 8 rats of each group were euthanized. When establishment of experimental model of NAFLD rats was confirmed, the remaining 26 HFD fed rats were randomly subdivided into 3 subgroups: HFD2 group (8 rats), dietary intervention group (8 rats) and metformin treatment group (10 rats). The remaining 8 rats of normal control group continued previous feeding (control diet) for another 8 weeks. The protein levels of RBP4 in serum and liver tissues were detected through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western blotting and immunohistochemistry. The expression of RBP4 mRNA in liver tissues was measured via reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: NAFLD model rats were successfully established by HFD. Liver tissues of HFD fed rats showed progressing NAFLD histology, with the NAFLD activity score (NAS) increasing from 4.67 ± 0.52 (on the 8th week) to 6.83 ± 1.33 (on the 16th week) ($z = -2.69$, $P < 0.01$). Both dietary and metformin intervention alleviated impaired liver histology; NAS: dietary intervention group vs. HFD2 group (6.83 ± 1.33 vs. 3.00 ± 1.26 , $z = -2.853$, $P < 0.01$); metformin treatment group vs. HFD2 group (6.83 ± 1.33 vs. 5.33 ± 0.52 , $z = -2.047$, $P < 0.05$). Serum RBP4 protein levels showed no significantly difference among HFD fed groups, metformin and dietary intervention groups. The protein and mRNA expressions of RBP4 in liver tissues decreased in HFD fed groups, concomitantly with elevated liver enzymes, dyslipidemia and insulin resistance ($P < 0.05$). Dietary intervention increased RBP4 expression in liver tissue as

well as improving liver enzyme, dyslipidemia and insulin resistance ($P<0.05$). But metformin treatment had little impact on those above indexes. What is worse, it elevated ALT level ($P<0.05$).

Conclusions: Serum RBP4 is not a sensitive marker of NAFLD progression. RBP4 expression in rat liver decreases in response to the occurrence of NAFLD and dietary intervention increases the hepatic expression of RBP4 in rats with NASH, it is suggested that liver RBP4 may play a role in the pathogenesis of NAFLD. Metformin treatment can alleviate NAFLD histology, but the toxicity of metformin to the liver should be considered. Dietary intervention is the fundamental treatment of NAFLD.

Key words: NAFLD pathogenesis; RBP4; dietary intervention; metformin

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
中文目录.....	V
英文目录.....	VII
第一章 前言.....	1
第二章 材料与方法.....	3
2.1 材料.....	3
2.2 方法.....	8
2.3 统计学处理.....	17
第三章 结果与分析.....	18
3.1 大鼠体重、肝湿重及肝指数的变化.....	18
3.2 血清 RBP4 及其他生化指标的变化.....	20
3.3 肝组织病理变化.....	22
3.4 免疫组织化学法测肝组织 RBP4 蛋白表达结果.....	24
3.5 Western 免疫印迹法测肝脏 RBP4 蛋白表达结果.....	26
3.6 肝组织 RBP4 mRNA 的表达.....	27
第四章 讨论.....	29
结论与展望.....	32
参考文献.....	33
综述.....	39

参考文献	45
------------	----

致谢	49
----------	----

厦门大学博士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Materials and Methods	3
2.1 Materials.....	3
2.2 Methods.....	8
2.3 Statistical analysis.....	17
Chapter 3 Experimental results and analysis	18
3.1 Body and liver parameters.....	18
3.2 Fasting serum biochemical parameters.....	20
3.3 Liver pathology.....	22
3.4 Immunohistochemical findings of RBP4 in the liver.....	24
3.5 Western blotting findings of RBP4 in the liver.....	26
3.6 RT-PCR findings of RBP4 mRNA in liver tissue.....	27
Chapter 4 Discussion	29
Conclusion and expectation	32
Reference	33
Review	39
Reference	45
Acknowledgement	49

第一章 前言

随着生活水平的提高和生活方式的改变,肥胖症及其相关的代谢综合征发病率日益增加,严重威胁人类健康;与肥胖相关的代谢性疾病的预防、早期诊断和干预迫在眉睫。非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是除酒精和其他明确损肝因素外的一种以肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征,其与肥胖和胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)密切相关。据不完全统计,NAFLD在北美一些国家的普通人群患病率为20%~30%,是影响公众健康的主要慢性肝脏疾病之一^[1,2],在我国已成为仅次于慢性病毒性肝炎的第二大肝病^[3,4]。NAFLD的病理类型包括非酒精性单纯性脂肪肝(Nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌^[5]。尽管NAFL预后一般良好,但有些病人可发展为NASH,并可进展为肝硬化和肝功能衰竭^[5]。目前关于NAFLD的发病机理尚未完全阐明。

脂肪组织既是能量储存库,同时也是活跃的内分泌器官,其分泌的脂肪细胞因子可从不同层面影响胰岛素效应^[6]。2005年, Yang^[7]等利用基因芯片鉴定出一种新的脂肪因子RBP4,其在体内负责结合、转运血浆中的维生素A,是视黄醇类结合蛋白家族中的一员,分子量为21~25kDa,主要由肝细胞合成,其次为脂肪组织合成;研究提示肥胖小鼠脂肪组织中RBP4升高,引起肌肉组织IR和肝组织磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)表达升高,最终导致机体IR,从而证实RBP4与肥胖、IR密切相关。而肥胖、IR又是NAFLD发生、发展的独立危险因素,因此, RBP4与NAFLD的关系正逐渐受到人们的关注。

许多研究发现,血清RBP4分泌增加与肝脂肪变和肝损害相关,血清RBP4可能是NAFLD的独立相关因素^[8-10]。但是,目前血清RBP4在NAFLD中的表达水平仍存在争议。Sofer E^[11]等研究发现RBP4与NAFLD无相关性,但也有多项研究发现NAFLD患者血清RBP4水平表达降低^[12-14]。另外,人们对RBP4在肝脏中的表达情况以及它与肝脏病理变化之间的关系知之甚少。因此, RBP4与NAFLD之间的

关系需进一步研究明确。

由于NAFLD 发生发展的确切机制还未阐明，因此目前关于NAFLD 的防治措施还比较局限，主要局限于生活方式的干预和针对该病并发症的治疗。目前生活方式的改变在NAFLD的治疗中证明是有效的，其中饮食干预是防治NAFLD的有效方法之一，但是大多数病人并不能坚持实施，这就迫切需要某种有效药物的出现^[15]。二甲双胍通过参与糖脂代谢，可增强胰岛素敏感性，而NAFLD与IR密切相关，因此，许多研究评估了二甲双胍对NAFLD的疗效，发现二甲双胍能有效治疗NAFLD^[16,17]。但是饮食干预和二甲双胍治疗NAFLD的具体作用机制仍不清楚。由于饮食干预和二甲双胍治疗均可减轻体重和增强胰岛素敏感性，而肥胖、IR又与RBP4 密切相关。因此，推测饮食干预和二甲双胍可能通过影响RBP4 的表达而发挥治疗NAFLD的作用。本实验以高脂饮食建立NAFLD大鼠模型，并予饮食或二甲双胍干预该模型，动态分析各实验组大鼠血清RBP4、肝脏RBP4 蛋白和mRNA的表达水平及肝脏病理变化情况，研究RBP4 与肝脏病理变化之间的关系及饮食、二甲双胍干预对NAFLD的作用，探讨饮食干预和二甲双胍是否是通过影响RBP4 的表达而发挥治疗NAFLD的作用，为研究NAFLD的发病机制和防治方法提供一定的理论依据。

第二章 材料与方法

一、材料

1 实验动物

SPF/VAF 级远交系 SD 大鼠 (Sprague-Dawley rat) 50 只, 雄性, 6 周龄, 体重 200g 左右 (190~210g)。(购自中科院上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号: SCXK (沪) 2007-0005, 厦门大学医学院动物实验中心提供)。

2 主要实验药品及试剂

- (1) 高脂高能量大鼠饲料: 苏州双狮实验动物饲料科技有限公司。
- (2) 普通大鼠饲料: 厦门大学医学院动物实验中心提供。
- (3) 二甲双胍 (格华止): 中美上海施贵宝制药有限公司产品。
- (4) RBP4 ELISA 试剂盒: 美国 Adipogen 公司产品。
- (5) 胰岛素 ELISA 试剂盒: 美国 Millipore 公司产品。
- (6) 甘油三酯试剂盒-TG (酶法) (干粉): 普利莱基因技术有限公司产品。
- (7) 总胆固醇试剂盒-CHO (酶法) (干粉): 普利莱基因技术有限公司产品。
- (8) 低密度脂蛋白胆固醇试剂盒-LDL-C (选择性沉淀法): 北京北化康泰临床试剂有限公司产品。
- (9) 高密度脂蛋白胆固醇试剂盒-HDL-C (选择性沉淀法): 北京北化康泰临床试剂有限公司产品。
- (10) 谷草转氨酶 (赖氏法): 南京建成生物工程研究所。
- (11) 谷丙转氨酶 (赖氏法): 南京建成生物工程研究所。
- (12) 葡萄糖测定 (葡萄糖氧化酶, 计时安培电流法): 强生稳豪试纸、强生稳豪血糖仪。
- (13) 兔抗大鼠 RBP4 单克隆抗体 (ALX-210-440): 美国 Enzo Life Sciences 公司产品。
- (14) 兔 β -Actin 单克隆抗体 (EP1123Y): 美国 Epitomics 公司。
- (15) 羊抗兔 IgG 抗体 (GAR007): 中国联科生物技术有限公司。

(16) 兔超敏二步法免疫组化检测系统(PV-9001 试剂①: Polymer Helper 聚合物辅助剂; 试剂②: poly-HRP 抗兔/酶聚合物): 美国 GBI 公司生产, 北京中杉金桥生物科技有限公司分装稀释。

(17) 内源性过氧化物酶阻断剂、DAB 显色试剂盒、柠檬酸组织抗原修复液(100×, PH=6.0)、抗体稀释液: 福州迈新生物技术开发有限公司。

(18) 封闭用正常山羊血清(原液): 索莱宝科技有限公司。

(19) PBS、TAE 缓冲液: 上海双螺旋生物科技有限公司。

(20) 10%水合氯醛溶液: 我院制剂室配制。

(21) 二甲苯、苏木精、伊红等常规病理检查所用试剂均由我院病理科提供。

(22) 4%多聚甲醛固定液: 江苏碧云天生物技术研究所以。

(23) Trizol: Invitrogen 公司。

(24) DEPC 处理水、MarkerI DNA Ladder: 索莱宝科技有限公司。

(25) 无水乙醇、甲醇: 广东光华科技股份有限公司。

(26) 氯仿、异丙醇: 国药集团化学试剂有限公司。

(27) 琼脂糖: BOWEST 香港分公司。

(28) DuRed nucleic acid gel stain (核酸染料): 北京泛博生物化学有限公司。

(29) cDNA 逆转录试剂盒: Fermentas 公司。

(30) Taq 酶(Dream Taq Green PCR Master Mix)(2×): Thermo scientific 公司。

(31) RIPA 蛋白质裂解液: 江苏碧云天生物技术研究所以。

(32) 4×蛋白上样缓冲液、30%丙烯酰胺、TRIS、甘氨酸(Glycine)、过硫酸铵、吐温(Tween-20): 索莱宝科技有限公司。

(33) 十二烷基硫酸钠(SDS): 美国 Chembasebio 公司。

(34) Tris-盐酸缓冲液(1.5M, PH8.8): 上海双螺旋生物科技有限公司。

(35) 四甲基乙二胺(TEMED): Sigma 公司。

(36) PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus 蛋白预染 marker: Thermo scientific 公司。

(37) PVDF 膜(2.2μm 孔径): 美国 Amersham 公司。

(38) 脱脂奶粉: 内蒙古伊利实业集团股份有限公司。

(39) ECL 化学发光显色液: 厦门鹭隆生物工程技术有限公司。

(40) 氯化钠、氢氧化钠：国药集团化学试剂有限公司。

3 仪器设备

(1) L600 台式低速离心机：湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

(2) 低温离心机：德国 Eppendorf 公司。

(3) 4℃冰箱、-20℃冷柜：海尔公司。

(4) -80℃冰箱：美国 Thermo Scientific 公司。

(5) BR680 型酶标仪：日本 BIO-RAD 公司。

(6) 显微镜：德国 Leica 公司。

(7) 图象系统：IM150 系统。

(8) Excelsior 型生物组织自动脱水机、Histocentre 3 型组织包埋机、HM315 型轮转切片机：赛默飞世尔科技仪器公司。

(9) 电热恒温鼓风干燥箱：上海精宏实验设备有限公司。

(10) 隔水式恒温培养箱：上海一恒科学仪器有限公司。

(11) SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台：苏州净化设备有限公司。

(12) Milli-Q Biocel 纯水仪：美国 Millipore 公司

(13) 蛋白质电泳仪：美国 Biorad 公司

(14) 蛋白转移装置：美国 Biorad 公司

(15) TS-8 型摇床：海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

(16) TS-1 型脱色摇床：海门市麒麟医用仪器厂。

(17) 化学发光凝胶成像系统 (FluorChem E)：美国 CB 公司。

(18) 双模块梯度 C-1000 PCR 仪：美国 Biorad 公司

(19) 核酸测定仪：美国 Thermo Scientific 公司

(20) 全自动凝胶成像分析系统：上海天能科技有限公司。

(21) AB104-N 型电子分析天平：上海梅特雷.托利多公司

(22) 微量加样器：德国 Eppendorf 公司。

(23) 超声破碎仪：美国 SONICS MATERIALS 公司。

(24) 振荡器、磁力搅拌器：德国 IKA 实验室技术公司。

(25) 微波炉：韩国三星集团。

(26) 其他常用器械：量筒、烧杯、玻片、盖玻片、吸管、滴管、玻片架等。

4 主要试剂配制方法

(1) 75%乙醇：用 DEPC 处理水和无水乙醇以 1:3 体积比配制，置于 4℃ 冰箱保存备用。

(2) 2.0%琼脂糖凝胶配制：天平称取 2.0g 琼脂糖置于三角烧瓶中，加入 TAE (1×) 100ml，轻轻摇匀。置于微波炉中，低火加热，沸腾后取出，静置待液体稍冷却后加 DuRed nucleic acid gel stain (核酸染料) 10μl，轻轻摇匀铺板。

(3) RIPA 裂解液：50mM Tris (MW 121.14, PH 7.5) 3.02g, 150mM NaCl 4.38g, 1% TritonX-100 5ml, 1%脱氧胆酸 5g, 0.1% SDS 0.5g 加蒸馏水至 500ml, 调 pH 值至 7.5。混匀后 4℃ 保存，长期保存于-20℃。使用时，1ml RIPA 裂解液加入蛋白酶抑制剂 1mmol/L PMSF 10μl。

(4) 100mmol/L PMSF：PMSF 17.4mg，异丙醇 1ml，溶解后分装于 1.5ml 离心管中，-20℃ 保存。

(5) 4×蛋白上样缓冲液：1.0mol/L Tris·HCl (pH6.8) 2ml, SDS 0.8g, 溴酚蓝 0.04g, 甘油4ml, 去离子水定容至10ml。混匀后，分装于1.5ml离心管中，4℃ 保存。

(6) PBS 缓冲液：氯化钠 8.0g，氯化钾 0.2g，磷酸氢二钠 3.58g，磷酸二氢钾 0.27g，双蒸水定容至 1000mL，调 pH 值至 7.4。

(7) 1.0mol/L Tris·HCl (pH6.8)：Tris (MW121.14) 12.114g，蒸馏水100ml溶解后，(用浓盐酸调pH值至6.8)，室温下保存。

(8) 1.5mol/L Tris·HCl (pH8.8)：Tris (MW121.14) 18.671g，蒸馏水100ml溶解后，(用浓盐酸调pH值至8.8)，室温下保存。

(9) 10%SDS：SDS 10g，加蒸馏水至100ml室温保存。

(10) 10%过硫酸胺 (AP)：过硫酸胺0.1g，加蒸馏水1ml (现用现配，可先将过硫酸胺干粉称好分量后放在1.5ml EP管中，一次性多装几管，使用时加入蒸馏水即可，溶解后，4℃ 保存，保存时间为1W)。

(11) 四甲基乙二胺原液 (TEMED)：原液分装，4℃避光保存。

(12) 30%丙烯酰胺：原液分装，4℃保存。

(13) 12%下层胶 (两块胶，15ml)：

依次加入	去离子水	4.9ml
	30%丙烯酰胺	6.0ml

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库